

山楂叶总黄酮对乳鼠心肌细胞缺血缺氧损伤的实验研究

叶希韵,张隆,张静,王耀发(华东师范大学生命科学学院,上海 200062)

摘要:目的 研究山楂叶总黄酮对缺血缺氧损伤后心肌细胞的影响。方法 以 3d 龄 SD 乳鼠心室肌进行心肌细胞培养并建立缺血缺氧损伤模型。研究山楂叶总黄酮对缺血缺氧心肌细胞心率失常、停搏时间、细胞乳酸脱氢酶 (LDH) 的泄漏量、细胞丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和一氧化氮 (NO) 含量等生化指标的影响。结果 山楂叶总黄酮能减轻缺血缺氧损伤后心肌细胞心率失常的程度,推迟心肌细胞的停搏时间,减少心肌细胞 LDH 的释放量,降低 MDA 含量并提高细胞内 SOD 酶的活力和 NO 的含量。结论 山楂叶总黄酮对缺血缺氧损伤的心肌细胞具有明显的保护作用。

关键词:山楂叶总黄酮;心肌细胞;缺血缺氧

中图分类号: R965; R541 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)03-0202-03

Effect of hawthorn leaves flavonoids on cultured myocardial cell injury by hypoxia-no glucose

YE Xi-yun, ZHANG Long, ZHANG Jing, WANG Yao-fa (The College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of hawthorn leaves flavonoids on cultured myocardial cell injury by hypoxia-no glucose. **METHODS** Three days neonatal rat ventricular was used as cell culture and hypoxia-no glucose damaged myocardial cell as experimental method. The influences of hawthorn leaves flavonoids on arrhythmias, beating stop, content of LDH, MDA, SOD, NO in medium was studied. **RESULTS** The hawthorn leaves flavonoids showed good protection against the damage of hypoxia-no glucose myocardial cell and could lighten arrhythmias, prolong the time of myocardial cell beating, decrease the LDH and MDA, and improve the activity of SOD and NO content. **CONCLUSION** Hawthorn leaves flavonoids has significant protective effects on the damage of hypoxia-no glucose myocardial cell.

KEY WORDS: hawthorn leaves flavonoids; myocardial cell; hypoxia-no glucose

心脏病是目前严重威胁人类身体健康的疾病之一。心绞痛、心肌梗死和缺血性心脏病等共同的病理基础都是心肌缺血。心肌供血供氧不足导致心肌代谢紊乱,能量供应不足,心肌收缩功能下降,血液输出量降低,进而影响整个机体的功能,乃至引起心肌细胞死亡^[1]。因此如何保护缺血损伤的心肌细胞乃是医学上急待解决的问题。1974年 Deluca^[2]建立了体外培养心肌细胞缺血性损伤实验模型,该模型后又经李连达^[3]和 Webster等^[4]加以改进完善。研究发现体外培养的心肌细胞是研究药物抗心肌缺血很好的实验模型^[5,6]。有研究表明^[7,8]:山楂叶中的总黄酮能使冠状动脉扩张,有降血脂、降血压和强心作用,能改善心脏活力和兴奋中枢神经系统的作用。我们实验研究还证明^[9]山楂叶总黄

酮具有抗氧化功能,对血管内皮细胞的氧化损伤具有明显的保护作用。但由于山楂叶总黄酮对心肌细胞缺血缺氧损伤方面的研究目前我们尚未见报道,故本实验以体外培养的乳鼠心肌细胞为实验材料,通过建立缺血缺氧细胞模型,研究了山楂叶总黄酮对心肌细胞缺血缺氧损伤的影响,为深入详细地阐述山楂叶总黄酮的药理作用研究提供进一步实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

MEM培养基、无糖 MEM培养基: GIBCO公司产品;辅酶 I、胰蛋白酶: Sigma公司产品;特级小牛血清: 细胞所实生公司产品;丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)试剂盒: 购自

南京建成生物工程研究所;山楂叶总黄酮(实验室定制,含量64%,配成32 mg/mL);SD乳鼠:购自上海医科大学实验动物部。

1.2 心肌细胞培养

按 Webster等^[4]方法进行心肌细胞培养。取新生3dSD乳鼠(雌雄均可)50只,在无菌条件下取其心室肌剪碎,经0.1%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,离心收集后,用含20%小牛血清的MEM培养基制成浓度为 5×10^5 /mL细胞悬液接种于培养瓶中,置于37℃恒温培养箱中培养。

1.3 心肌细胞缺血缺氧模型建立

按李映欧^[5]方法稍加改进给心肌细胞造成缺血缺氧损伤,即将培养3d同步搏动的心肌细胞换用高纯氮气饱和的无糖MEM培养基,并于培养瓶内充氮气30s,将瓶内空气置换出。37℃恒温培养箱密闭培养,造成心肌细胞缺血缺氧损伤,观察损伤6,12h后的细胞形态,并进行各生化指标测定。

1.4 实验细胞分组

将培养的心肌细胞随机分为六组:正常组、缺血缺氧组、缺血缺氧+山楂叶总黄酮(0.001 mg/mL)、缺血缺氧+山楂叶总黄酮(0.005 mg/mL)、缺血缺氧+山楂叶总黄酮(0.01 mg/mL)、缺血缺氧+山楂叶总黄酮(0.1 mg/mL)。每组10瓶细胞,损伤6h和12h后各组分别取出5瓶细胞进行实验和生化指标检测。

1.5 实验方法^[10]

按照2,4-二硝基苯肼显色法测乳酸脱氢酶(LDH)活性;按照试剂盒方法测SOD和MDA含量;用BACKMAN DU-7紫外分光光度计测定LDH、SOD、MDA含量。按照荧光法用HITACHI 850荧光分光光度计测定NO含量。

1.6 统计学处理

实验数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较采用t检验。以上统计用Excel统计软件完成。

2 结果

2.1 各组细胞光镜下的形态学观察

正常组心肌细胞间相互连接同步搏动,且搏动有节奏,有力度,在12h内随时间变化细胞形态没有明显变化。缺血缺氧组在损伤6h时可见心肌细胞内颗粒明显增多,胞体开始收缩,搏动的节奏表现为时快时慢,不太稳定。缺血缺氧组损伤12h后心肌细胞内颗粒增多非常明显,胞体收缩成一团,搏动无节奏,细胞表现为明显的心率失常症状。如继续缺血缺氧损伤24h,则大部分心肌细胞停止搏动,小部分细胞开始死亡。在心肌细胞缺血缺氧的同时加入不同浓度的山楂叶总黄酮6,12h后,细胞的形态和症状表现均比相应的损伤组有明显的好转,细胞内颗粒有所减少,细胞间连接增多,搏动节奏有所恢复,效果与山楂叶总黄酮的浓度成正相关。加山楂叶总黄酮后,在同样情况下继续培养24h,大部分心肌细胞仍然在搏动,直到56h后细胞才完全停止搏动。

2.2 不同实验时间各组细胞LDH泄漏量的测定

不同实验时间缺血缺氧组的LDH泄漏量均明显比正常组高,差异非常显著($P < 0.001$)。而山楂叶总黄酮各组均在

不同程度上抑制了LDH的泄漏,且呈量效关系。说明山楂叶总黄酮能防止心肌细胞中乳酸脱氢酶的泄漏,对细胞膜的稳定性起到一定的作用。结果见表1。

表1 不同实验时间各组细胞LDH泄漏量的测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The results of LDH leakage in different experiment time ($\bar{x} \pm s$)

组别	瓶数	6h LDH (U/L)	12h LDH (U/L)
正常组	5	1506 ±20.7	1558 ±22.8
缺血缺氧组	5	2128 ±63.4*	2770 ±34.2*
缺血缺氧+山楂叶总黄酮 (0.001 mg/mL)	5	2088 ±17.2	2765 ±56.4
缺血缺氧+山楂叶总黄酮 (0.005 mg/mL)	5	1926 ±56.7	2742 ±45.3
缺血缺氧+山楂叶总黄酮 (0.01 mg/mL)	5	1818 ±49.6**	2234 ±67.8***
缺血缺氧+山楂叶总黄酮 (0.1 mg/mL)	5	1774 ±55.3***	2154 ±42.5****

注:与对照组比较,* $P < 0.001$;与缺血缺氧组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

Note: compared with control group: * $P < 0.001$; compared with hypoxia-no glucose group: ** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

2.3 不同实验时间各组细胞MDA含量的测定

不同实验时间缺血缺氧组的MDA含量也明显高于相应正常组,差异非常显著($P < 0.001$)。山楂叶总黄酮各组不仅减低了MDA含量,而且其效果与山楂叶总黄酮浓度成正相关。说明山楂叶总黄酮具有保护细胞防止脂质过氧化和氧自由基损伤的作用。结果见表2。

表2 不同实验时间各组细胞MDA含量的测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 MDA contents in different experiment time($\bar{x} \pm s$)

组别	瓶数	6h MDA [nmol/10 ⁶ (cells)]	12h MDA [nmol/10 ⁶ (cells)]
正常组	5	0.281 ±0.04	0.298 ±0.01
缺血缺氧组	5	0.472 ±0.01*	0.514 ±0.05*
缺血缺氧+山楂叶总黄酮 (0.001 mg/mL)	5	0.464 ±0.01	0.502 ±0.03
缺血缺氧+山楂叶总黄酮 (0.005 mg/mL)	5	0.457 ±0.03	0.467 ±0.02
缺血缺氧+山楂叶总黄酮 (0.01 mg/mL)	5	0.383 ±0.01**	0.423 ±0.05***
缺血缺氧+山楂叶总黄酮 (0.1 mg/mL)	5	0.365 ±0.02***	0.408 ±0.02****

注:与对照组比较,* $P < 0.001$;与缺血缺氧组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

Note: compared with control group: * $P < 0.001$; compared with hypoxia-no glucose group: ** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

2.4 不同实验时间各组细胞SOD活性的测定

不同实验时间缺血缺氧组的SOD活性明显比相应的正常组低,差异非常显著($P < 0.001$)。山楂叶总黄酮各组能在不同程度上提高细胞SOD的活性,其效果与山楂叶总黄酮浓度成正相关。说明山楂叶总黄酮具有提高心肌细胞内SOD活性的能力,能起到保护细胞防止脂质过氧化的作用。结果见表3。

表 3 不同实验时间各组细胞 SOD活性的测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 SOD contents in different experiment time ($\bar{x} \pm s$)

组别	瓶数	6h SOD [U/mg(蛋白)]	12h SOD [U/mg(蛋白)]
正常组	5	2.18 $\pm$ 0.08	2.19 $\pm$ 0.11
缺血缺氧组	5	1.25 $\pm$ 0.11 [*]	1.22 $\pm$ 0.09 [*]
缺血缺氧 +山楂叶总黄酮 (0.001 mg/mL)	5	1.37 $\pm$ 0.07	1.39 $\pm$ 0.08
缺血缺氧 +山楂叶总黄酮 (0.005 mg/mL)	5	1.46 $\pm$ 0.10	1.48 $\pm$ 0.06
缺血缺氧 +山楂叶总黄酮 (0.01 mg/mL)	5	1.57 $\pm$ 0.06	1.76 $\pm$ 0.11 ^{**}
缺血缺氧 +山楂叶总黄酮 (0.1 mg/mL)	5	1.74 $\pm$ 0.13 ^{**}	1.88 $\pm$ 0.12 ^{**}

注:与对照组比较, ^{*} $P < 0.001$; 与缺血缺氧组比较, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$

Note: compared with control group: ^{*} $P < 0.001$; compared with hypoxia-no glucose group: ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$

2.5 不同实验时间各组细胞 NO含量的测定

不同实验时间缺血缺氧组的 NO含量明显比正常组低, 差异非常显著 ($P < 0.001$)。而山楂叶总黄酮各组均在不同程度上提高了 NO的含量, 结果呈量效关系。说明山楂叶总黄酮能提高心肌细胞中 NO的含量, 对心肌细胞的缺血缺氧损伤起到一定的保护作用。结果见表 4。

表 4 不同实验时间各组细胞 NO含量的测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 The results of NO contents in different experiment time ($\bar{x} \pm s$)

组别	瓶数	6h NO [nmol/10 ⁶ (cells)]	12h NO [nmol/10 ⁶ (cells)]
正常组	5	0.587 $\pm$ 0.07	0.632 $\pm$ 0.02
缺血缺氧组	5	0.412 $\pm$ 0.04 [*]	0.438 $\pm$ 0.03 [*]
缺血缺氧 +山楂叶总黄酮 (0.0001 mg/mL)	5	0.414 $\pm$ 0.02	0.464 $\pm$ 0.03
缺血缺氧 +山楂叶总黄酮 (0.001 mg/mL)	5	0.426 $\pm$ 0.06	0.483 $\pm$ 0.04
缺血缺氧 +山楂叶总黄酮 (0.01 mg/mL)	5	0.489 $\pm$ 0.03 ^{**}	0.511 $\pm$ 0.02 [*]
缺血缺氧 +山楂叶总黄酮 (0.1 mg/mL)	5	0.493 $\pm$ 0.05 ^{**}	0.525 $\pm$ 0.03 ^{**}

注:与对照组比较, ^{*} $P < 0.001$; 与缺血缺氧组比较, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$

Note: compared with control group: ^{*} $P < 0.001$; compared with hypoxia-no glucose group: ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$

3 讨论

离体培养缺血缺氧心肌细胞是一种常用的研究药物抗心肌缺血的实验模型^[5,6], 利用这个模型的目的是模拟缺血心肌的病理状态, 同时可以排除神经、体液等复杂因素的影响。体外培养的心肌细胞在实验中具有准确、可靠、经济、简便、快速、重复性好、可比性强、又易于观察、易于生化测定等优点, 可以从细胞水平、分子水平探索缺血心肌组织的病理机制和药物抗心肌缺血的机制, 是实验研究的好材料、好方法。

LDH是心肌细胞内酶, 在正常情况下, 可有少量 LDH从心肌细胞漏出, 进入血浆。当心肌细胞受到损伤的时候, 心肌细胞中的 LDH会从细胞中大量泄漏出来, 造成心肌细胞代谢紊乱, 导致心肌损伤。其受损程度越大, 泄漏量也越大。现已有研究资料表明缺血缺氧可导致心肌细胞中自由基与脂质过氧化产物 MDA含量的增高, 自由基与 MDA参与心肌损伤^[11]。研究还发现^[12]一氧化氮与动脉粥样硬化关系密切, NO可舒张血管, 具有抗氧化、抑制 SMC增殖, 减少或消除血小板聚集粘着, 防止血栓形成等作用, 因此 NO被认为是一种抗动脉粥样硬化的活性分子。本实验结果表明, 山楂叶总黄酮能减轻缺血缺氧损伤后的心肌细胞心率失常的程度, 推迟心肌细胞的停搏时间, 减少由缺血缺氧损伤引起的心肌细胞 LDH的释放量, 同时也能减少心肌细胞内 MDA含量并提高细胞内 SOD酶的活力和 NO含量。说明山楂叶总黄酮对缺血缺氧损伤的心肌细胞具有一定的保护作用。这可能与山楂叶总黄酮具有抗脂质过氧化损伤和清除氧自由基能力及有稳定细胞膜的作用等有关, 因而对山楂叶总黄酮生物活性的进一步深入研究将具有一定的理论意义和实践应用价值。

参考文献

[1] 陈灏珠. 心血管病学新理论与新技术 [M]. 上海: 上海科技教育出版社, 2000, 351.

[2] Deluca M A. Biochemical responses of myocardial cells in culture to oxygen and glucose Deprivation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1974, 59(2): 749.

[3] 李连达. 心肌细胞的培养极其形态学的初步观察 [J]. 中华心血管病杂志, 1981, 9(3): 216.

[4] Webster KA, Discher DJ, Bishopric NH. Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes [J]. J Biol Chem, 1993, 268: 16852.

[5] 李映欧. 野菊花提取物 CF-2 对体外培养乳鼠心肌细胞缺血缺氧性损伤的保护作用 [J]. 中西医结合杂志, 1981, 1(2): 91.

[6] 陈清, 魏丕敬, 顾培坤, 等. 关附甲素对培养心肌细胞“缺氧缺糖”的保护作用 [J]. 药学实践杂志, 2000, 18(5): 331.

[7] 许正斌, 高奎斌, 许双贵. 山楂叶综述 [J]. 中医药学报, 1985, 4: 49.

[8] 斯建勇, 陈迪华, 高兴跃. 云南山楂叶化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(7): 422.

[9] 叶希韵, 王耀发. 山楂叶总黄酮对血管内皮细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 中国现代应用药理学杂志, 2002, 19(4): 265.

[10] 张均田主编. 现代药理实验方法 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 1315.

[11] 陈尚恭, 句松海. 氧自由基与心肌缺血、再灌注损伤 [J]. 中国心血管药理学通讯, 1991, 9: 10.

[12] Paul R. Myers, Miles A. Tanner vascular endothelial cell regulation of extracellular matrix collagen role of nitric oxide [J]. Arterioscler Thromb, 1998; 18: 717.

收稿日期: 2003-09-16